

平成23年 3月24日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21790220
 研究課題名（和文）
 新規破骨細胞分化メカニズム—カルシウムオシレーション非依存的メカニズム—の解明
 研究課題名（英文） The identification of a novel mechanism of osteoclast differentiation that is calcium oscillation-independent osteoclastogenesis
 研究代表者
 黒田 有希子 (KURODA YUKIKO)
 独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・基礎科学特別研究員
 研究者番号： 70455343

研究成果の概要（和文）：

IRBIT ノックアウトマウス由来の細胞を用いた解析により、IRBIT をノックアウトすると多核の破骨細胞形成が亢進することが分かった。IRBIT ノックアウト細胞では、破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションを呈する細胞の割合が増えていること、細胞融合のステップが亢進していることから、 IP_3R を介したカルシウムシグナルが細胞融合を亢進する働きを担っていること、そのカルシウムシグナルは IRBIT によって負に制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

By analysis of osteoclasts derived from IRBIT knockout mice, we found that the number of RANKL-induced Ca^{2+} oscillation positive cells was increased in IRBIT knockout mononuclear osteoclasts and that IRBIT knockout cells enhanced cell-cell fusion step during osteoclastogenesis as compared with wild-type cells. These results indicate that IRBIT negatively regulates IP_3R -mediated Ca^{2+} signaling and cell-cell fusion step during osteoclast differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：分化、破骨細胞、カルシウムオシレーション、細胞融合

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症をはじめとする骨疾患患者の増加は現代社会の大きな問題であり、早期の骨

疾患の原因究明・新規治療薬の開発が望まれている。そのため、近年では、骨形成機構の分子レベルでの解析、特に、骨吸収活性を持つ破骨細胞の

分化に関する研究が精力的に行われている。その一端として、1)破骨細胞の分化には転写因子 NFATc1 (nuclear factor of activated T cells)の活性が必要かつ十分であること、2)破骨細胞分化因子 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand)による破骨細胞分化誘導時においてカルシウムオシレーションが観察されることが報告された (Takayanagi H. et al. (2002) Dev. Cell 3, 889-901)。その後も、ITAMモチーフをもった DAP12/FcR γ (Koga T. et al. (2004) Nature 428, 758-63)、PLC γ 2 (Mao D. et al. (2006) J. Clin. Invest. 116, 2869-79)や RGS10 (Yang S. and Li YP. (2007) Genes Dev. 21, 1803-16)といったカルシウムオシレーションに関わる分子のノックアウトマウスに関する報告が次々となされ、いずれも破骨細胞分化に異常があることが証明された。つまり、これら一連の研究を通して、破骨細胞の分化や活性化に細胞内カルシウム動態が深く関わっていることが明らかとなってきた。

一方、申請者が所属する研究室で長年研究を行ってきたイノシトール3リン酸受容体 (IP $_3$ R)は細胞内カルシウム動態に深く関与することが様々な現象で明らかにされている分子である。そこで申請者は破骨細胞分化における IP $_3$ R、および IP $_3$ R を介した細胞内カルシウムシグナルの役割を明らかにするため、IP $_3$ R ノックアウトマウスの解析を行なった。その結果、申請者は IP $_3$ Rが破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションに必須な分子であること、および IP $_3$ R ノックアウトマウス由来の細胞では RANKL 添加による破骨細胞単独培養系による破骨細胞分化が完全に阻害されることを明らかにした。さらに、今までの知見からの予想に反し、IP $_3$ R ノックアウトマウス由来の細胞は破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションが欠如しているにも関わらず、骨芽細胞との共存培養下では破骨細胞分化が誘導されることを発見した。つまり、申請者は、生体内での破骨細胞分化には、現在までに報告されていたカルシウムオシレーション依存的分化メカニズムに加え、全く報告のなかったカルシウムオシレーション非依存的な分化メカニズムが存在する、という新しい概念を提唱した (Kuroda Y. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 105, 8643-8)。

2. 研究の目的

生体内における破骨細胞分化の制御メカニズムを理解する上で、カルシウムオシレーション非依存的な分化メカニズムの解明は重要な課題である。そこで、本研究では、過去の知見と申請者の行なってきた研究結果から、IP $_3$ と IP $_3$ R の擬似体と考えられる IP $_3$ R 結合

タンパク質の一つである IRBIT に重点をおき、これらの分子が破骨細胞分化においてどのような役割を担っているか、特にカルシウムオシレーション非依存的な破骨細胞分化メカニズムにおける役割について検討する。一般的な培養細胞等では IP $_3$ R のリガンドである IP $_3$ が産生されると、その直後からカルシウムオシレーションが観察されるのに対し、破骨細胞においては、IP $_3$ 産生を担う PLC は RANKL 添加直後に産生されているにも関わらず、IP $_3$ R を介したカルシウムオシレーションは RANKL 添加後 24 時間以降にしか観察されない。このことから、破骨細胞分化誘導時の IP $_3$ 産生機構および IP $_3$ 動態は未だ不明な点が多いと考え、この点を明らかにすることが、真の破骨細胞分化メカニズムを理解する上で重要であると考え。また、申請者が所属する研究室でクローニングされたタンパク質 IRBIT は自身のリン酸化によって IP $_3$ と競合して IP $_3$ R の活性を制御する IP $_3$ の擬似体とも言える分子である (Ando et al. (2006) Mol Cell, 22, 795-806)。申請者はこの IRBIT の破骨細胞分化誘導時の機能に注目し、現在までに、IRBIT と IP $_3$ R の結合が破骨細胞の分化状態によって異なること、および、破骨細胞内の IRBIT を siRNA によってノックダウンした結果、破骨細胞分化が著しく促進されることを発見した(未発表データ)。これらの結果から、IP $_3$ 同様、IP $_3$ の擬似体とも言える IRBIT も破骨細胞分化において重要な役割を担っていると考え、IRBIT の破骨細胞分化における役割を明らかにしていきたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞分化時における IP $_3$ 動態の経時的観察および IP $_3$ の破骨細胞分化における役割の解明
破骨細胞内における IP $_3$ 動態の経時的観察には、IP $_3$ sensor- IRIS (Matsu-ura T et al. (2006) J. Cell. Biol. 173, 755-65) を用い、発現量や発現時期等の条件検討を行なった後、破骨細胞分化誘導時における IP $_3$ 動態を経時的に観察する。
また、破骨細胞における IP $_3$ の役割を明らかにするためには、IP $_3$ spongeを用いることを計画している。IP $_3$ sponge は IP $_3$ R に比べて約 1000 倍の IP $_3$ 結合能を有するタンパク質で、細胞に発現させると細胞外刺激による IP $_3$ -induced Ca $^{2+}$ release (IICR) を抑制することが報告されている (Uchiyama T et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 8106-13)。そこで、本研究では、破骨細胞における IP $_3$ の役割を明らかにすることに焦点を絞るため、破骨細胞に IP $_3$ sponge を発現させ、破骨細胞の分化に対する影響を観察する。以上の実験により、破骨細胞分化のどの時期に IP $_3$ が重要な働きを担っているのかが明らかになった場合には、破骨細胞特異的に発現するプロモーターを用いた IP $_3$ -sponge トランスジェニックマウスを作製し、生体内の破骨細胞分化における IP $_3$ の役割を調べる。

(2) IRBIT の破骨細胞分化における役割の解明

IRBIT は自身のリン酸化状態によって IP₃R やその他の機能分子との結合が制御されていることから、破骨細胞分化誘導開始からの IRBIT の発現量、局在、およびリン酸化状態を RT-PCR、免疫染色やウエスタンブロッティング法を用いて細かく解析し、IRBIT がどのような修飾を受けた際に破骨細胞分化に影響を及ぼすのかを解析する。また、IRBIT がカルシウムオシレーション依存性・非依存性の破骨細胞分化メカニズムのそれぞれにおいて、どのような役割を果たしているのかを調べるために、IRBIT ノックアウト細胞の破骨細胞分化を破骨細胞単独培養系、骨芽細胞との共存培養系において観察する。

IRBIT に対する抗体を用いた免疫染色を行なった結果、破骨細胞、骨芽細胞の両方に IRBIT が発現していることが明らかとなった（未発表データ）。そこで、生体内の破骨細胞分化における IRBIT の機能を明らかにするため、IRBIT トータルノックアウトマウスに加え、破骨細胞特異的 IRBIT コンディショナルノックアウトマウスの作製を計画している。

4. 研究成果

近年、破骨細胞による骨破壊が様々な病気と関連していることが報告されているが、生体内での詳細な破骨細胞分化制御機構は未だ明らかになっていない点が多い。現在までに報告されている破骨細胞分化に異常を示すノックアウトマウスの知見から、破骨細胞分化を誘導するシグナル伝達経路において IP₃ および、IP₃ の擬似体とも言える IRBIT の役割を解明することがカルシウムオシレーション非依存性の分化メカニズムの解明に繋がると考え、本研究で IP₃ および IRBIT の破骨細胞分化における役割を明らかにすることを中心に研究を行なった。

IP₃ の役割を解明するため、まず取り組んでいた IP₃ の可視化については、本研究期間内は条件検討に取りかかる段階までしか進めることができなかった。当初の実験目的にも記したように、破骨細胞分化を理解する上で IP₃ の役割を解明することは重要な課題である。従って、この課題については今後も継続し、破骨細胞分化誘導時における IP₃ の可視化ができるよう、条件を検討していきたいと考えている。

一方、IRBIT の破骨細胞分化における役割については、IRBIT が RANKL 添加による破骨細胞分化誘導前後で IP₃R との結合が異なることに加え、細胞内局在も変化していることが分かった。IRBIT 自身のリン酸化状態は非

常に複雑に制御されており、未だ解明できていない。しかしながら、IRBIT 自身の修飾を明らかにすることは IRBIT の役割を解明するためには必ず必要である。そのため、IRBIT 自身の修飾機構については今後も解析を続けていきたいと考えている。

本研究期間内には IRBIT コンディショナルノックアウトマウスの作製にまでは至らなかったが、トータルノックアウトマウスの作製、および解析を行うことはできた。IRBIT ノックアウトマウス由来の細胞を用いた解析により、IRBIT をノックアウトすると「細胞融合」のステップが亢進し、結果として多核の破骨細胞形成が亢進することが明らかとなった。破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションは頻度や大きさには有意な差がみられなかったが、カルシウムオシレーションを呈する細胞の割合が IRBIT ノックアウト細胞で明らかに増えていた。申請者は、破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションは IP₃R を介していること、IRBIT と IP₃R は破骨細胞内で結合していることを見つけている。このことから、IP₃R を介したカルシウムシグナルが細胞融合を亢進する働きを担っていること、そのカルシウムシグナルは IRBIT によって負に制御されていることが明らかとなった（図 1）。また、カルシウムオシレーション依存性および非依存性の破骨細胞を誘導する骨芽細胞との共存培養系においても IRBIT ノックアウト細胞の分化亢進が観察された。このことから、カルシウムオシレーション非依存性の破骨細胞分化メカニズムにおける IRBIT の役割についても継続して調べていきたいと考えている。以上の結果より、本研究において、IRBIT が破骨細胞分化の細胞融合のステップを負に制御している分子であることが明らかとなった。

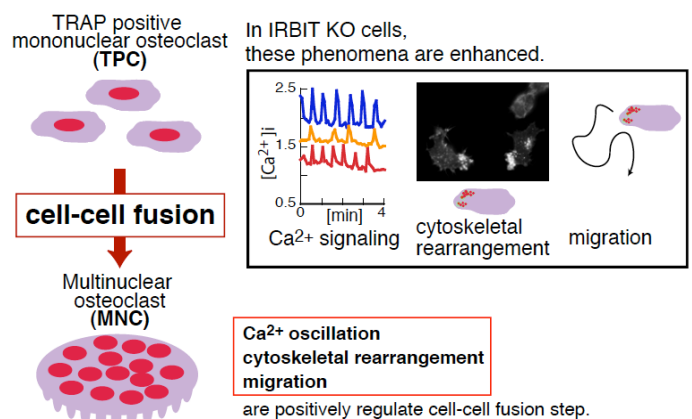


図 1 本研究のまとめ

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Kiefer H, Mizutani A, Iemura S, Natsume T, Ando H, Kuroda Y, Mikoshiba K.

Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-binding protein released with inositol 1,4,5-triphosphate (IRBIT) associates with components of the mRNA 3' processing machinery in a phosphorylation-dependent manner and inhibits polyadenylation.

J Biol Chem. 284(16):10694-705 (2009) 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

① 黒田有希子、久恒智博、中村健、松尾光一、御子柴克彦

生体内における破骨細胞分化はカルシウムオシレーション依存的・および非依存的メカニズムによって制御されている

第10回運動器科学研究会

2009年9月18日 東京

② 水谷顕洋、御子柴克彦、安東英明、黒田有希子、河合克宏

IRBITの中樞神経系における分布について

第32回日本神経科学大会

2009年9月16日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 有希子 (KURODA YUKIKO)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・基礎科学特別研究員

70455343